第 40 卷 第 2 期　　昆 虫 学 报　　Vol. 40, No. 2
1997 年 5 月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　May, 1997

小菜蛾抗性个体不敏感乙酰胆碱酯酶的鉴定

王 靖　袁家珪　孙耘芹　EL-Said Fawag Abdalla
（中国科学院动物研究所 北京 100080）　（国立研究中心植保系 开罗 埃及）

摘要 乙酰胆碱酯酶（AChE）敏感性降低是小菜蛾对有机磷和氨基甲酸酯产生抗性的重要机制之一，已得到广泛的承认和报道。一种用硝酸纤维素膜的斑点法鉴定个体小菜蛾的抗性 AChE 不敏感性的应用技术，提供了早期侦测和随后监测田间种群抗性的可能性。此法操作简便灵敏。小菜蛾抗性品系（GBR）和田间种群成虫头部 AChE 活力，在残杀威抑制时，抑制率分别为50.97 %和43.96 %，有对氧磷存在时，分别为63.78 %和35.87 %，较敏感品系的 AChE 为不敏感。

关键词 小菜蛾，抗药性，乙酰胆碱酯酶，氨基甲酸酯

小菜蛾 *Plutella xylostella*（L.）是世界性的十字花科的重要害虫之一。在温带地区，一般每年发生4～6代；在热带地区，每年发生18代左右。在我国的广东省，每年小菜蛾可完成20代左右。由于小菜蛾的繁殖速度快，发育不整齐，世代重叠，所以对杀虫剂的抗药性发展迅速。小菜蛾抗药性在一些国家中有报道，如日本 Hama[1]，美国 Tabashnik 等[2]，澳大利亚 Altman[3]以及中国台湾和南方省份 Liu 和 Sun[4]，吴世昌等[5]和陈言群等，不仅对一般化学杀虫药剂而且对昆虫生长调节剂和微生物农药苏云金杆菌 *Bacillus thuringiensis*（Berliner）都有抗性产生。由于小菜蛾抗药性问题日趋严重和突出，自1985年第一届国际小菜蛾治理研讨会之后，对小菜蛾抗性机制和治理策略进行了广泛的研究。用增效剂测试出小菜蛾对拟除虫菊酯的抗性机制是体内的氧化酶解毒作用后[6~8]，Yao 等[9]用离体试验，证明了台湾地区小菜蛾幼虫对氰戊菊脂的抗药性和艾氏剂环氧化酶有关，陈言群等[10]证实了艾氏剂环氧化酶在量及质上的差异及细胞色素 P-450含量的提高是导致小菜蛾抗性发生和发展的重要机制之一。Sun 等[11]和唐振华等[12]报道了乙酰胆碱酯酶的不敏感性是有机磷杀虫剂的共同抗性机制，并开展了害虫抗药性的快速测定方法研究。国外学者用分子生物学和生物化学方法侦测研究了昆虫的抗性与技术[13~16]。随着害虫抗药性的严重发展，要求有简捷灵敏的害虫抗性早期测报技术，并能在实验室内进行害虫抗药性比较，更有效地用于抗药性预测并为抗药性治理提出合理对策。

为此，本工作根据小菜蛾对有机磷和氨基甲酸酯杀虫剂产生抗性的乙酰胆碱酯酶不敏感性的作用机制，研究能迅速测定田间小菜蛾种群抗性个体频率的方法，从而可得出害虫的抗性预测，以便达到合理的抗性治理之目的。

1995-07-14收稿，1996-05-14收修改稿

1　材料和方法

1.1　供试小菜蛾

敏感品系：JS 品系由日本住友化学工业株式会社提供。抗性品系：GBR 抗性品系于1988年采自广东省宝安县马田菜场[17]。后在室内用氰戊菊酯和马拉松交替处理。东莞种群（DG）于1994年采自广东省东莞菜场，采集前该场用有机磷杀虫剂对小菜蛾进行防治。

1.2　供试药品、试剂和仪器

对氧磷（Paraoxon），90%纯度，Sigma 产品。残杀威（Propoxur），96%纯度，湖南化工研究所提供。碘化硫代乙酰胆碱（Acetylthiocholine iodide，即 ATCh），Sigma 产品。5，5-二硫-双（2-硝基苯甲酸）（5，5-dithio-bis（2-nitrobenzoic acid）即 DTNB），Fluka 产品。柠檬酸钠（Tri-sodium citrate），上海试剂一厂产品。其它化学试剂均为分析纯或化学纯。硝酸纤维素膜，0.45 μm 规格，中国产品。携带式彩色光密度计（Densitometer Rcp Model）为美国 Tobias Associates 公司产品。

1.3　生物测定

按照 FAO[18]法，选小菜蛾3龄幼虫，用 CO_2麻醉，将配制的系列浓度的杀虫剂丙酮液以0.43 μL 量点滴在幼虫的胸部背板上，并设有丙酮对照，24 h 后检查死亡率。计算所得结果的 LD_{50}、回归方程式和95%的可信限等。

1.4　AChE 活性及其残留活性测定

将羽化后2 d 的小菜蛾成虫头部剪下后放在瓷比色盘的小槽内，加入5 μL 的100 mmol/L磷酸缓冲液(pH7.5)，用玻璃棒匀浆后，再加入45 μL 同样缓冲液使之均匀混合。取一小张（1 cm×1 cm）擦镜纸，放在匀浆液上，滤出的上清液作为酶源。用毛细管移液器取每槽内的酶液分别滴在大小合适的三张硝酸纤维素膜上。当斑点干后，立即进行下一试验步骤或放入口袋内保存于冰箱中。将三张膜分别放入三个塑料口袋中。

A 袋：50 mL 水中加入25 μL 酒精；

B 袋：50 mL 水中加入25 μL、100 mmol/L 残杀威酒精溶液；

C 袋：50 mL 水中加入25 μL、10 mmol/L 对氧磷酒精溶液。

塑料口袋在30 ℃条件下保温15 min 后移出纤维素膜并用蒸馏水冲洗。冲洗后的膜在配好的显色液中显色。显色液配制应依顺序加入。

a. 17 mL 蒸馏水；

b. 25 mL　100 mmol/L 磷酸缓冲液（pH7.5）；

c. 1 mL　100 mmol/L 柠檬酸钠；

d. 2 mL　30 mmol/L 硫酸铜；

e. 4 mL　100 mmol/L 铁氰化钾（现配制）；

f. 1 mL　5 mmol/L 碘化硫代乙酰胆碱（现配制）。

残杀威处理组的显色液中需再加25 mL、10 mmol/L 残杀威，以避免 AChE 的可逆反应。

在室温中放置3.5 h，时时摇动有显色液的培养皿。最后用水冲洗，干燥后存在信封中。

将光密度计波长调节钮调到蓝色点，在此波长范围内测量膜上各斑点的光密度(OD)值。

2 结果

2.1 抗性水平

GBR 品系对有机磷杀虫剂马拉松和敌敌畏以及氨基甲酸酯杀虫剂灭多威的敏感性比 JS 敏感品系的敏感性明显降低，抗药性分别为 JS 品系的13.8，10.1和5.4倍(表1)。

表1 有机磷和氨基甲酸酯对室内小菜蛾品系的毒力

品系	杀虫剂	LD_{50} μg/虫	回归方程式 $Y=a+bx$	LD_{50} 置信限	R/S
JS	敌敌畏	0.27	$7.86+2.39x$	0.19～0.37	1.0
	马拉松	0.78	$6.71+2.37x$	0.19～0.29	1.0
	灭多威	0.25	$6.31+1.17x$	0.12～0.58	1.0
GBR	敌敌畏	3.67	$5.10+2.06x$	2.45～5.43	13.8
	马拉松	7.86	$4.76+0.86x$	3.11～9.86	10.1
	灭多威	1.35	$5.42+0.86x$	0.64～3.04	5.4

2.2 AChE 活力测定

用硝酸纤维素膜的斑点法，测得的小菜蛾敏感品系和抗性品系成虫头部的 AChE 活力值(表2)。

表2 小菜蛾成虫头部 AChE 活力

品系	AChE 活力 (OD 值)	标准差 ±*SD*	R/S
JS	0.12	0.05	1.00
GBR	0.17	0.05	1.88
东莞种群	0.18	0.07	2.00

表中结果显示，室内汰选的 GBR 品系的 AChE 活力为 JS 品系的1.88倍；1994年从东莞菜场采集的小菜蛾 AChE 活力为 JS 品系的2倍，表明了抗性品系和田间种群的小菜蛾成虫头部的 AChE 活力较敏感品系为高。

2.3 AChE 不敏感性

在有残杀威、对氧磷杀虫剂存在时，敏感和抗性品系成虫头部 AChE 的残留活性频数分布图（图1和图2）显示出，JS 品系的残留频数的分布中心位置对残杀威和对氧磷分别在0.03～0.05，和0.02～0.05之间，而 GBR 系的活力频数中心分别在0.04～0.06和0.05～0.06，说明抗性品系比敏感品系成虫头部 AChE 活力在有机磷或氨基甲酸酯抑制后，存有较高的活力。对广州东莞田间小菜蛾种群，在有上述两种药剂抑制时，AChE 残留活力的频数中心范围较宽，从0.02到0.17和0.02～0.23均有出现，表明了田间小菜蛾种群的 AChE 对两种杀虫剂抑制的不敏感性抗性机制为遗传杂合状态。

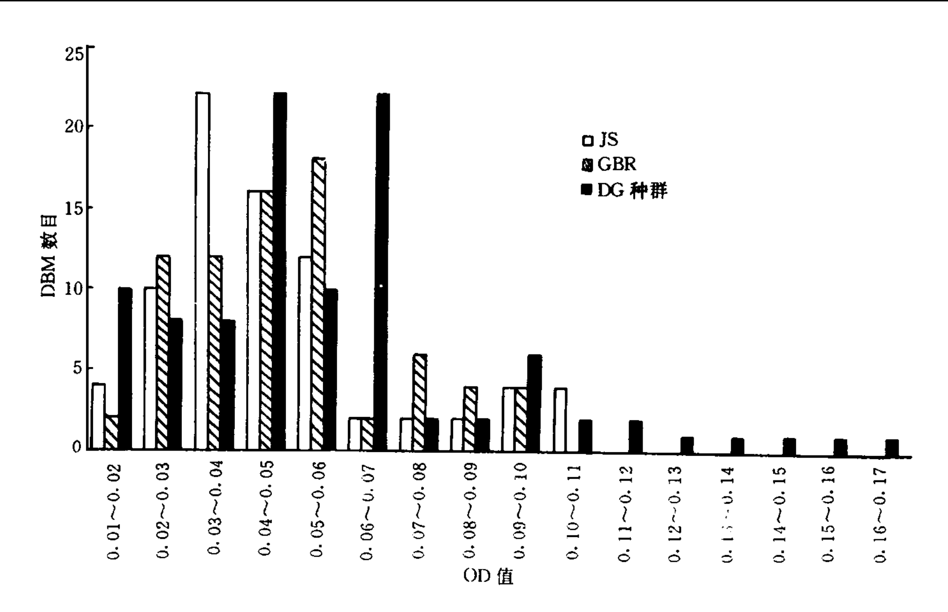


图1　小菜蛾 AChE 抑制频数分布（残杀威抑制）

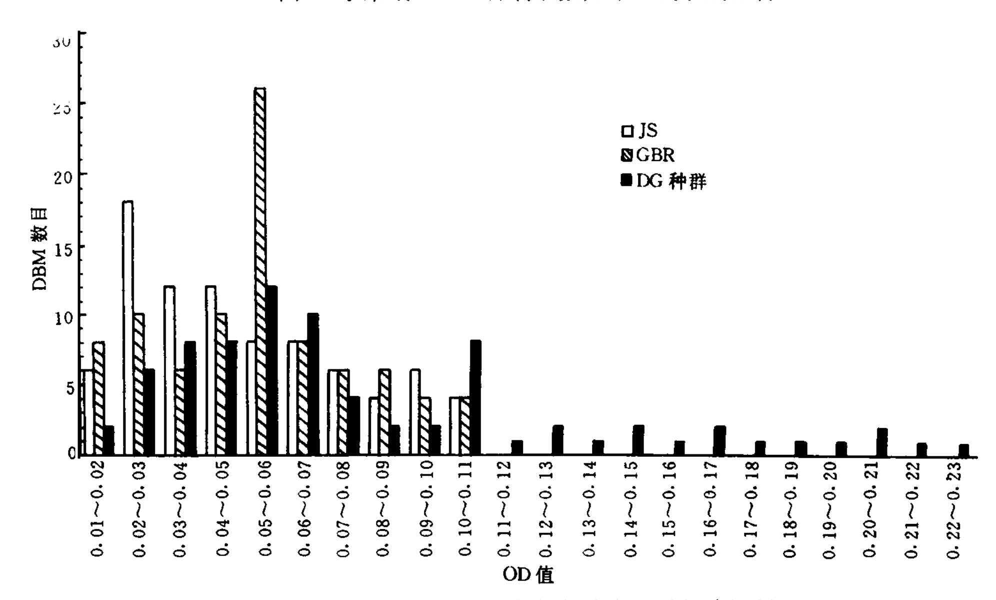


图2　小菜蛾 AChE 抑制频数分布（对氧磷抑制）

以小菜蛾品系或种群的 AChE 活力被残杀威或对氧磷杀虫剂抑制百分率计算(见表3)，所得结果也显示出，在残杀威抑制时，GBR 品系在 DG 种群 AChE 活力抑制百分率分别为50.97%和43.98%，有对氧磷存在时，分别为63.76%和35.87%，均较 JS 品系 AChE 为不敏感。

表3　小菜蛾成虫头部 AChE 活力在杀虫剂存在时的抑制百分率

品系	AChE 抑制百分率（%）	
	残杀威	对氧磷
JS	52.94	34.66
GBR	50.97	63.76
DG	43.96	35.87

AChE 抑制百分率（%）＝

$$\frac{\text{全酶活 OD 值}-\text{残留酶活 OD 值}}{\text{全酶活 OD 值}}\times 100\%$$

3 讨论

害虫抗药性侦测和监测是抗药性治理的重要环节。治理策略是要降低抗药性等位基因频率、降低显性和减少遗传型，以达到防治和延缓抗药性和延长现用农药的使用寿命以及提高其效果之目的。目前，检测昆虫抗药性的生物化学和分子生物学技术有替代过去传统生物测定的趋势。由于后者费虫费时，不能了解害虫的抗药性机制，测定害虫个体抗药性的生化机制的实际可行方法为田间种群早期侦测及以后的监测提供了可能性。

早期 Pasteur 与 Georghiou[19]曾报道了蚊虫酯酶的滤纸斑点法。随后，类似方法也用在其它害虫[20,21]。在此基础上，进而发展了对蚊虫的 AChE 不敏感性抗性机制的测定技术[22]。AChE 对抑制剂作用不敏感性是一些昆虫对有机磷和氨基甲酸酯抗性的重要机制之一[23,24]，AChE 敏感性降低也是小菜蛾对有机磷和氨基甲酸酯产生抗性的主要机制[25]。

本研究用硝酸纤维素膜的斑点法，能够鉴定小菜蛾个体不敏感乙酰胆碱酯酶的抗性特征，测定此种机制是否存在于抗性种群中，在不同种群之间的差别和测出种群中该基因的分布频率，为早期抗性预测和治理提供依据。这种生化技术测定 AChE 可在25 ℃室温中制成 AChE 活力斑点，选择一个合适的药剂抑制浓度后，可立即或数日后集中在实验室内进行杀虫剂抑制和显色。此斑点法具有简便、快速、准确和成本低之优点。本研究除了用光密度计直接测定外，根据 AChE 在膜上斑点反应的颜色，制成系列的色谱条，并标出用光密度 OD 值，使试验结果与色谱条比较。从田间试验的数据也证实了斑点法能预测小菜蛾对有机磷和氨基甲酸酯杀虫剂的抗性。为了使该方法能够广泛应用，当抗性频率>10%时，应及时地向植保部门和农药销售部门以及农民提供动态信息，Rouch 和 mille[26]报道，取样50头害虫，就可证实抗性频率是否>10%，且准确性达95%。在相对低的频率情况下，能快速、准确地测出抗性害虫个体频率，达到及时预报的目的。

参 考 文 献

1 Hama H. Resistance to insecticides due to reduced sensitivity of acetylcholinesterase. In: Georghiou G P, Saito T eds. Pest Resistance to Pesticides. New York: Plenum, 1983, 299～331

2 Tabashnik B E, Cushing N L, Johnson M W. Diamondback moth (Lepioptera: Plutellaidae) resistance to insecticide in Hawaii: intraisland and cross-resistance. J. Econ. Entomol., 1987, **80**: 1 091

3 Aitmann J A. An investigation of resistance in cabbage moth (*Plutella xylostella* L.) to Pyrethoids in the Lockyer Valley. Graduate Diploma, Thesis, (Queensland Agricultural college, Lases, Queensland, and Australes. 1988

4 Liu M Y, Sun C N, Huang S W, Absence of synergism of DDT by piperonyl butoxide and DMC in larvae of diamondback moth (Lepidoptera: Yponomeutidae), J. Econ. Entomol., 1982, **75**: 964

5 吴世昌，顾言真. 杀灭菊酯对小菜蛾的毒效检测. 植物保护，1986，**12**：19～20

6 Liu M Y, Chen J S, Sun C N. Synergism of pyrethroids by several compounds in larvae of the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol., 1984, **77**: 851

7 Chen J S, Sun C N. Resistance of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) to a combination of fenvalerate and piperonyl butoxide. J. Econ. Entomol., 1986, **79**: 22

8 Noppun V M, Saito T, Mityata T. Cuticular penetration of s-fenvalerate in fenvalerate resisant and susceptible strains of diamondback moth *Plutella xylostella* (L.), Pestic, Biochem, Physiol, 1989, 33～83

9 Yao M G, Hung C F, Sun C N. Fenvalerate resistance and aldrin epoxidation in larvae of the diamondback moth. Pestic. Biochem. Physiol., 1988, **30**: 272

10 陈言群，杨　帆，孙耘芹. 艾氏剂环氧化酶及细胞色素 P-450对小菜蛾抗药性发展的影响. 昆虫学报，1994，**37**：280～285

11 Sun C N, Wu T K, Chen J S, Lee W T. Insecticide resistance in diamondback moth. In: Talekar N S, Griggs T D ed. Diamondback Moth Management: Proc. Ist Intern, Workshop, Asian Vegetable Research and Development Center, Shanhua, Taiwan, 1986, **359**: 371

12 唐振华，周成理. 抗性小菜蛾的乙酰胆碱酯酶不敏感性. 昆虫学报，1992，**35**（4）：385～391

13 Brown T M, Brogdon W G. Improved detection of inseciticide resistance through conventional and molecular techniques. Annu. Rev. Entomol., 1987, **32**: 145

14 Field L M, Devonshire A L, Frengh-Constat R H, Forde B G. The combinned use of immno-assay a DNA diagnostic technique to identify insecticide resisant genotypes in the peachpotato aphid, *Myzus persicae* (Sulz) Pesic. Biochem. Physiol., 1989, **34**: 174

15 Dary O, Georghiou G P, Parsons E, Pasteur N. Microplate adapation of Gomon's assay for quantitative determination of general esterase activity. J. Econ. Entomol., 1990, **83**: 2 187

16 Ferrari J A, Morse J G, Georghiou G P, Sun Yunqin. Elevated esterase activity and acetylchlinesterase insensityivity in citrus thrips (Thysanoptera: Thripidae) populations from the San Joaquin Valley of California. J. Econ. Entomol., 1993, **86**: 1 645

17 陈言群，孙耘芹. 小菜蛾抗药性调查研究. 动物学集刊，1992，**9**：17～21

18 FAO. Method for larvae of the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. FAO Method, 1980, **21**: 119

19 Pasteur N, Georghiou G P. Improved filter paper test for detecting and quantifying increased esterase acticity in organophosphate-resistant mosquitoes (Diptera: Culicidae). J. Econ. Entomol., 1989, **82**: 347

20 Ozaki K. The resistance to organophosphorus insecticides of the green rice leafhopper, *Nephotettix cineticeps* (Ihler), and the smaller brown planthopper. Rev. Plant Protec. Res., 1969, **2**: 1

21 Ress A T, Field W N, Hitechen J M. A simple method of identifying organophosphate insecticide resistance in adults of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. J. Am. Mosq. Control Assoc., 1985, **1**: 23

22 Dary O, Georghiou G P, Parsons E, Pasteur N. Dotblot test for identification of insecticide resistant acetylchlinesterase in single insect. J. Econ. Entomol., 1991, **84**: 28

23 Hama H. Resistance to insecticide due to reduced sensitivity of acetylcholinesterase. In: Georghiou G P, Saito T eds. Pest Resistance to Pesticides. New York: Plenum, 1983, **299**: 331

24 Dary O G, Georghiou P, Parsons E, Pasteur N. Microplate adaption of Gomon's assay for quantitative determination of general esterase activity. J Econ. Entomol., 1990, **83**: 2 187

25 Sun C N, Wu T K, Chen J S, Lee W T. Insecticide resistance in diamondback moth. In: Talekar N S, Griggs T D ed. Diamondback Moth Management: Proc. Ist Intern. Workshop. Asian Vegetable Research and Development Center, Shanhua, Taiwan, 1986, **359**: 371

26 Roush R T, Miller G L. Considerations for design of insecticide resistance monitoring programs. J. Econ. Entomol., 1986, **79**: 293

TECHNIQUE FOR IDENTIFICATION OF INSENSITIVE ACETYLCHOLINESTERASE IN RESISTANT INDIVIDUALS OF DIAMONDBACK MOTH

Wang Jing Yuan Jiagui Sun Yunqin
(*Institute of Zoology, Academia Sinica Beijing* 100080)
El-Said Fawag Abadalla
(*Plant Protection Department, National Research Centre Cairo Egypt*)

Abstract Acetylcholinesterase insensitivity is an important mechanism of resistance of diamondback moth (*Plutella xylostella* (L.)) to organophosphorus and carbamate insecticides, which has been widely recognized and documented. A dot-blot on nitrocellulose membranes technique for identification of insensitive AChE in single insect provides the opportunity for early detection and subsequent monitoring of resistance in field population. The technique is simple, sensitive and inexpensive. The percentages of inhibition of AChE activities in resistant strain (GBR) and field population (DG) were 50.97% and 43.96% respectively in the presence of propoxur and were 63.76% and 35.87% respectively in the presence of paraoxon. The results showed the GBR and DG had a higher degree of AChE insensitivity to OP and carbamate than did the susceptible strain.

Key words *Plutella xylostella* (L.), resistance, acetylcholinesterase, organophosphorus, carbamate